



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 01 139 A 1**

⑥1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 02 B 21/00**  
G 02 B 21/16  
G 02 B 26/10

②1 Aktenzeichen: 198 01 139.3  
②2 Anmeldetag: 14. 1. 98  
④3 Offenlegungstag: 15. 7. 99

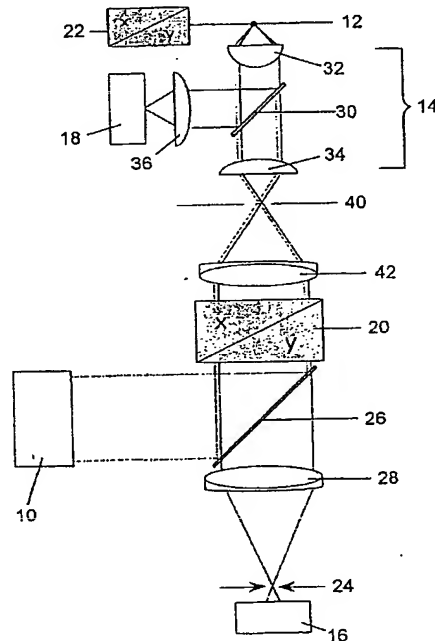
DE 198 01 139 A 1

⑦1 Anmelder:  
Uhl, Rainer, Dr., 82166 Gräfelfing, DE  
  
⑦4 Vertreter:  
Schwan, G., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 81739 München

⑦2 Erfinder:  
gleich Anmelder  
  
⑥6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
zu ziehende Druckschriften:  
DE 195 10 102 C1  
DE 43 38 578 A1  
DE 37 42 806 A1  
US 55 57 452 A  
US 53 94 268 A  
US 53 63 190 A  
EP 07 18 656 A1  
  
JP Patent Abstracts of Japan:  
09203739 A;  
07311029 A;  
07174768 A;  
07134132 A;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑥4 Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop  
⑥7 Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung, welche Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt bündelt, mindestens einer Detektoranordnung zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung, welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung, die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt, wobei die Scanneranordnung Piezoaktoren zum Erzielen von Scannbewegungen zwischen Abtastlichtstrahl und Objekt aufweist. Die Detektoranordnung kann einen Flächensensor aufweisen, der eine konfokale Blende bildet. Die Lichtquelle kann zur Abgabe von Rechteckimpulsen ausgelegt sein. Bei Auslegung des Mikroskops für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie kann ein zur Beleuchtung des Objekts vorgesehenes Objektiv zugleich zum Sammeln eines Teils der von dem Objekt emittierten Photonen genutzt sein, und hinter einem Kondensator des Objektivs kann ein zweiter Detektor platziert sein.



DE 198 01 139 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung, welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt bündelt, mindestens einer Detektoranordnung zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung, welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung, die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt.

Eine schematische Prinzipdarstellung eines derartigen Mikroskops, welches auch als Scanning-Mikroskop bezeichnet wird, ist in Fig. 1 wiedergegeben. Die wesentlichen Baugruppen des hier dargestellten Luminiszenz-Mikroskops sind:

- eine kollimierte Lichtquelle 10, zumeist ein Laser, zur Anregung eines Objekts 12,
- eine insgesamt als Mikroskop 14 bezeichnete optische Anordnung, welche das Licht der Anregungslichtquelle 10 als Beleuchtungs-Spot, insbesondere als beugungslimitierten Spot, auf das Objekt 12 bündelt und welche gleichzeitig das emittierte Licht wieder aufammelt und einem Detektor 16 bzw. 1 (siehe unten) zuführt,
- eine Scanvorrichtung, welche entweder den Beleuchtungs-Spot relativ zu dem zu untersuchenden Objekt (Scanvorrichtung 20) oder das zu untersuchende Objekt relativ zum Spot (Scanvorrichtung 22) bewegt und somit zur Abtastung dient, und
- ein oder mehrere Detektor(en) 16 bzw. 18 zur Registrierung des von dem Objekt 12 emittierten Lichts.

Ein derartiges punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop kann insbesondere als konfokales Mikroskop und/oder als ein nach dem Zwei- oder Mehrphotonenprozeß arbeitendes Mikroskop ausgelegt sein.

Im ersten Fall ist der bzw. sind die Detektoren hinter einer konfokalen Blende 24 positioniert (Detektorposition 16), welche in der Bildebene in einem dem gerade beleuchteten Objektpunkt konjugierten Punkt angebracht ist. Wie aus Fig. 1 ersichtlich ist, verläuft hierbei der Strahlengang des von dem zu untersuchenden Objekt 12 emittierten Lichts über das Mikroskop 14, welches zum Bündeln des Anregungslichts auf das Objekt dient, sowie über einen dichroitischen Strahlteiler 26, der das Emissionslicht vom Anregungslicht trennt, und eine Linse 28 zu der konfokalen Blende 24 und den in der Detektorposition 16 angeordneten Detektor. Auf diese Weise wird Licht aus anderen Ebenen des Präparats als der interessierenden Fokus-Ebene weitgehend ausgeblendet, und es wird eine dreidimensionale Abtastung möglich.

In einer Sonderform der Scanning-Luminiszenz-Mikroskopie, wie sie oben angedeutet wurde, erfolgt die Anregung der Probe durch einen nichtlinearen Zwei- oder Mehrphotonenprozeß, welcher per se auf die Fokusebene beschränkt ist und damit in den meisten Fällen eine konfokale Blende unnötig macht. In diesem Fall ist es nicht erforderlich, das emittierte Licht die gesamte optische Anordnung rückwärts durchlaufen zu lassen. Ein Detektor kann auch bereits unmittelbar hinter das Objektiv plaziert werden (kein "Descanning"). Wie in Fig. 1 angedeutet, kann hierfür im Strahlengang des Mikroskops 14, d. h. zwischen Objek-

tiv 32 und Tubuslinse 34, ein dichroitischer Strahlteiler 30 vorgesehen sein, so daß das von dem Objekt 12 emittierte Licht direkt nach Passieren des Objektivs 32 aus dem Strahlengang ausgekoppelt und über eine weitere Tubuslinse 36 auf einen in der Detektorposition 18 angeordneten Detektor abgebildet wird. Das so zu einem gegebenen Zeitpunkt aufgesammelte Licht stammt prinzipbedingt immer aus dem gerade beleuchteten Fokuspunkt.

Obschon mit derartig aufgebauten Luminiszenz-Mikroskopen durchaus vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden, besteht weiterhin das Bedürfnis nach Verbesserungen auf diesem Gebiet. Der vorliegenden Erfindung liegt daher insbesondere die Aufgabe zugrunde, ein Luminiszenz-Mikroskop der eingangs genannten Art mit erhöhter Abtastgeschwindigkeit, verbesserter Auflösung, höherer Sammeleffizienz und/oder vereinfachter Bauart bereitzustellen.

Zur Lösung dieser Aufgabe weist erfindungsgemäß die Scanneranordnung eines punktabtastenden Luminiszenz-Mikroskops der eingangs genannten Art Piezoaktoren zum Erzielen von Scanbewegungen zwischen Abtastlichtstrahl und Objekt auf.

In fast allen bisher realisierten Konzepten wird der zur Beleuchtung dienende Spot mittels galvanometrischer Scanner in zwei Dimensionen über das Gesichtsfeld bewegt, weshalb dieser Vorgehensweise als Punktscan-Verfahren bezeichnet wird. Galvanometer-Scanner besitzen eine begrenzte Geschwindigkeit, insbesondere wenn einzelne Punkte gezielt "angefahren" werden sollen. Man wählt deshalb zumeist eine zeilenförmige Abtastung, wobei der zur Zeilenabtastung herangezogene Scanner sich sinusoidal bewegt, während der dazu orthogonale Scanner innerhalb eines Bildes lediglich eine lineare Bewegung durchzuführen hat. Die sinusoidale Bewegung ist nur eine schlechte Approximation an die an sich erwünschte Sägezahnbewegung. Ihr Hauptnachteil liegt darin, daß selbst wenn man ständig wechselnde Belichtungszeiten in Kauf nimmt, sich nur ein Bruchteil der gesamten Scanzeit für die Datenaufnahme nutzen läßt und ein beträchtlicher Teil des Präparats (nämlich der an den Wendepunkten gelegene) dem schädlichen Beobachtungslicht ausgesetzt wird, obwohl er gar nicht beobachtet werden soll. Diese Probleme lassen sich überwinden oder weitgehend abschwächen wenn gemäß der vorliegenden Erfindung Piezo-Aktoren eingesetzt werden, da diese prinzipiell schnellere Bewegungen ermöglichen.

Wie eingangs unter Bezugnahme auf die bei 20 und 22 in Fig. 1 gezeigten Scanvorrichtungen erwähnt, läßt sich eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt entweder durch Bewegen des Objekts oder durch Bewegen des Abtastlichtstrahls bewirken. Daher kann, um den Abtastlichtstrahl zu einer Scanbewegung in der betreffenden Scanrichtung zu veranlassen, für jede Scanrichtung des Abtastlichtstrahls ein mit einem Piezoaktor gekoppeltes optisches Element vorgesehen sein, das mittels des zugehörigen Piezoaktors verstellbar ist. Soll nicht der Abtaststrahl sondern stattdessen das Objekt bewegt werden, kann eine vorzugsweise mittels Piezoaktoren verstellbare optische Pinzette zum Verstellen des zu untersuchenden Objekts gegenüber dem Abtastlichtstrahl vorgesehen sein.

Unabhängig davon, ob die Relativbewegung zwischen Abtastlichtstrahl und Objekt durch Verstellen der Richtung des Abtastlichtstrahls oder durch Positionsänderung des Objekts hervorgerufen wird, kann die Scanneranordnung eine für Grobbewegungen zwischen Abtastlichtstrahl und Objekt sorgende Grob-Scannereinheit aufweisen, und die Piezoaktoren bzw. die optische Pinzette können Teil einer Fein-Scannereinheit sein.

Das vorliegend beschriebene System kann somit insbesondere dazu verwandt werden, klassische Scansysteme um

einen kleinen, deutlich schnelleren Zoombereich zu erweitern. In diesem Bereich soll eine genaue und schnelle Adressierung einzelner Punkte möglich werden. Dadurch kann in einem interessierenden Objekt jedweder uninteressante Hintergrund ausgeblendet (d. h. gar nicht erst abgetastet werden), welcher häufig einen Großteil der Bildinformation ausmacht. Die Piezoaktoren können auch im Zusammenspiel mit den Galvanometer-Scannern dazu benutzt werden, das Gesamtsystem zu beschleunigen, d. h. sie können dazu dienen, Fehler und Oberschwinger der Scanner zu kompensieren und die Sinusform seiner Bewegung mehr an die erwünschte Sägezahnform anzunähern.

Die oben genannte Aufgabe wird auch durch ein punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop der eingangs genannten Art gelöst, welches mit einer konfokalen Blende ausgestattet ist, wobei die Detektoranordnung einen Flächensensor, insbesondere einen CCD-Chip, aufweist, welcher selbst die konfokale Blende bildet. Hierbei kann der Flächensensor derart ausgelegt sein, daß Intensitätsinformationen von belichteten Pixeln des Flächensensors während des Scanvorgangs in eine Speicherzone des Flächensensors geschoben werden.

In praktisch allen heute verfügbaren konfokalen Mikroskopen werden Photomultiplier als Detektoren eingesetzt. Ihr Hauptvorteil ist ein außerordentlich niedriges Dunkelrauschen, welches die Detektion einzelner Photonen ermöglicht, ihr Hauptnachteil jedoch die geringe Quantenausbeute, welche lediglich im Spektralbereich unterhalb von 500 nm die 20%-Marke übertrifft. CCD-Chips dagegen können auch oberhalb 500 nm Quantenausbeuten von > 90% aufweisen, und die neueste Generation solcher Chips kann mit einem ebenfalls im Bereich weniger Elektronen angesiedelten Rauschen ausgelesen werden. In einem von Brakenhoff et al. vorgeschlagenen Konzept ("Confocal imaging with bilateral scanning and array detectors" G.J. Brakenhoff, K. Visscher, Journal of Microscopy, Vol. 165, Pr 1, Januar 1992, S. 139-146) werden solche CCD-Chips ebenfalls in ein konfokales Mikroskop eingebaut, allerdings durchläuft hier der Lichtstrahl nach Passieren der konfokalen Blende noch einmal eine zweidimensionale Scanvorrichtung, welche den Lichtstrahl in der Bildebene wieder an einem dem ursprünglichen Bildpunkt entsprechenden Punkt plaziert. Nach Abschluß des kombinierten Scan/Descan-Vorgangs kann somit am Flächensensor (CCD-Chip) ein konfokales Bild abgegriffen werden. Das Verfahren erlaubt nur einen einzigen Durchmesser der konfokalen Blende, welcher der Größe eines Pixels entspricht.

Im vorliegend vorgestellten Konzept fungiert der CCD-Chip selbst als (variable) konfokale Blende, welche synchron mit dem Scanvorgang bereits ausgelesen wird. Hierfür werden die Intensitätsinformationen der belichteten Pixel bereits während des Scanvorgangs kontinuierlich, oder bevorzugt pulsartig in der Übergangszeit zwischen zwei benachbarten Scanpunkten, in die Speicherzone des Chips geschoben, von der sie kontinuierlich ausgelesen werden können. Zu diesem Zweck sollte die elektronische Shiftfrequenz des Chips deutlich größer als die gewünschte Scanfrequenz des Mikroskops sein. Durch entsprechendes Binneneinzelnen einzelner Pixel kann entweder bereits während des Auslesevorgangs (on chip-binning), oder später mittels eines Rechners die Größe der konfokalen Blende frei variiert und den Gegebenheiten optimal angepaßt werden.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung lassen sich spektrale Informationen gewinnen, wenn zur Aufspaltung des von dem Objekt emittierten Lichts ein dispersives Element vorgesehen ist.

Zusätzlich oder alternativ zu den bisher beschriebenen Lösungswegen wird die der Erfindung zugrunde liegende

Aufgabe ferner durch ein punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop der eingangs genannten Art gelöst, welches für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ausgelegt ist, wobei erfindungsgemäß die Lichtquelle zur Abgabe von Rechteckimpulsen ausgelegt ist.

Die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie macht sich einen in den 30er Jahren vorhergesagten und in den 60er Jahren experimentell verifizierten nichtlinearen Effekt zunutze. Dabei werden Fluorophore nicht durch Photonen angeregt, deren Energie der Energiedifferenz zwischen Grund- und erstem angeregten elektronischen Zustand entspricht, sondern durch Photonen der halben Energie, d. h. der doppelten Wellenlänge. Einer der Hauptvorteile dieses Verfahrens besteht darin, daß langweiliges Licht viel tiefer in biologisches Gewebe eindringen kann.

Damit zwei Photonen in synergistischer Weise zusammenarbeiten können, müssen sie quasi gleichzeitig am Fluorophor ankommen. Dies erfordert außerordentlich hohe Photonenflußdichten, welche üblicherweise durch die Konzentration der eingesetzten Lichtdauerleistung auf sehr schnelle Laserpulse (Sub-Picosekunden) erzielt werden. Mit einer schnellen Folge (gewöhnlich 80-100 MHz) solcher Pulse können die nötigen Spitzenintensitäten erreicht und die Dauerbelastung des Präparats minimal gehalten werden.

Es ist leicht einsichtig, daß die erforderliche Dauerleistung umso geringer gehalten werden kann, je kürzer die applizierten Pulse sind. Aus diesem Grund wurden verstärkte Anstrengungen unternommen, die Pulslänge am Ort des Präparats unter 100 fs zu drücken. Nun hat sich aber gezeigt, daß hohe Photonenflußdichten auch negative Einflüsse auf das Präparat ausüben können. Auch wenn die Mechanismen der auftretenden Zellschädigungen noch nicht vollständig verstanden sind, so kann man bereits heute vermuten, daß sie mit dem Auftreten von gleichzeitiger 3-, 4- und Mehrphotonenabsorptionen einhergehen. Aus der Poissonstatistik ergibt sich, daß bei hoher Wahrscheinlichkeit einer erwünschten Zweiphotonenabsorption auch unerwünschte Mehrphotonenabsorptionen zu erwarten sind. Die Wirkung solcher Mehrphotonenabsorptionen entspricht der einer UV-Licht Exposition, welche biologische Systeme bekanntermaßen schädigt.

Dementsprechend wird gemäß der vorliegenden Erfindung ein Verfahren vorgeschlagen, welches die optimale Signalgüte bei minimaler Probenbelastung sicherstellt. Es geht von der Überlegung aus, daß eine Verringerung der Spitzenintensitäten zwar die Wahrscheinlichkeit erwünschter Zweiphotonenabsorptionen reduziert, noch mehr jedoch auch die von unerwünschten Mehrphotonenabsorptionen. Um die gleiche Signalstärke zu erzielen, muß bei einer Reduzierung der Spitzenintensität um den Faktor  $n$  der Puls  $n^2$  mal länger und damit die Dauerbelastung um den Faktor  $n^2/n = n$  gesteigert werden. So gesehen wäre die Belastung durch unerwünschte Mehrphotonenabsorptionen bei einer Dauerbeleuchtung am geringsten, jedoch wäre die Dauerbelastung der Probe damit auch unerträglich hoch. Ein Beispiel mag dies verdeutlichen: Will man mit Dauerlicht die gleiche Signalstärke erzielen wie mit einer 100 MHz Folge von 100 fs langen Pulsen, müßte die Dauerbelastung um den Faktor  $(10^5)^{-1/2}$ , d. h. mehr als 300× gesteigert werden. Dies ist natürlich nicht realistisch weil Photonen im nahen IR vom Wasser absorbiert werden und das biologische Material damit "gekocht" werden würde. Irgendwo zwischen 100 fs-Pulsen und Dauerlicht muß deshalb die optimale Pulslänge für die Zweiphotonen-Mikroskopie liegen. Das hier vorgestellte Verfahren zielt daher darauf, die optimale Pulslänge nicht mit der üblicherweise eingesetzten Gausschen Pulsform zu applizieren, sondern als Rechteck-Puls, denn ein rechteckiger Puls bietet die maximale Zweiphotonenanre-

gung bei minimaler Dauerlichtbelastung. Die effektive optimale Pulsdauer, die durchaus für unterschiedliche Präparate unterschiedlich sein kann, läßt sich hierbei durch einfache Versuche ermitteln.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung lassen sich die genannten Rechteckimpulse dadurch einfach mit hoher Flankensteilheit erzeugen, daß diese aus mehreren kurzen aufeinanderfolgenden Einzelimpulsen zusammengesetzt sind. Hierfür kann die Lichtquelle eine Anordnung zur Erzeugung einer ebenen Wellenfront sowie eine senkrecht zu der Ausbreitungsrichtung der ebenen Wellenfront angeordnete treppenförmige Transmissionsanordnung aufweisen, bei welcher es sich insbesondere um eine treppenförmige Anordnung von Glasplättchen handeln kann. Andere Methoden nach dem Stand der Technik zur Erzeugung eines rechteckigen Zeitprofils kommen ebenfalls in Frage. (z. B. zwei Beugungsgitter). Es ist allerdings darauf zu achten, daß alle Einzelpulse in der Objektiv-Pupille eine gleichmäßige Ortsverteilung aufweisen, da nur so eine beugungslimitierte Punktabbildung in der Objektebene gewährleistet ist.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird ferner durch ein punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop gelöst, welches für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ausgelegt ist und bei welchem ein zur Beleuchtung des Objekts vorgesehenes Objektiv zugleich zum Sammeln eines Teils der von dem Objekt emittierten Photonen genutzt ist, wobei hinter einem Kondensor ein zweiter Detektor plaziert ist.

Die Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung ist ein im wesentlichen auf den Fokus begrenzter Vorgang, da nur dort die benötigten hohen Spitzenintensitäten vorherrschen. Eine Konsequenz dieser Tatsache ist, daß quasi-konfokale Bilder, d. h. Bilder mit einer drei-dimensionalen Information ohne Zuhilfenahme eines konfokalen "Pinholes" aufgenommen werden können: Alles Licht, welches zu einem gegebenen Zeitpunkt von einer Probe emittiert wird, muß seinen Ausgangspunkt in der jeweiligen Fokusposition haben. Damit ist es nicht mehr nötig, sich zur Messung der Emission ausschließlich der gleichen Optik zu bedienen, welche zur Erzeugung des Fokuspunktes diente, sondern es lassen sich einfache Anordnungen realisieren, welche zu einer beträchtlichen Steigerung der Sammeleffizienz führen.

Die einfachste derartige Anordnung bedient sich, analog zum Stand der Technik, eines Objektivs zur Erzeugung des abtastenden Beleuchtungsspots, benutzt zum Sammeln der emittierten Photonen, jedoch nicht ausschließlich das Objektiv (sogenannte Auflichtfluoreszenz), sondern auch einen auf der gegenüberliegenden Seite plazierten Kondensor. Da keine Abbildungseigenschaften gefordert werden, kann ein Kondensor der höchsten numerischen Apertur (gewöhnlich ein Ölkondensor mit  $NA = 1,4$ ) eingesetzt werden, welcher bis zu 50% allen emittierten Lichtes erfaßt. Kombiniert mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur lassen sich damit Sammeleffizienzen von  $> 70\%$  realisieren.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird des weiteren auch durch ein punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop gelöst, welches für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ausgelegt ist und bei welchem im Strahlengang des Mikroskops ein Langpaßfilter angeordnet ist, welcher langwelliges Anregungslicht passieren läßt, von dem Objekt reflektiertes Fluoreszenzlicht jedoch reflektiert. Auf diese Weise läßt sich ebenfalls die Sammeleffizienz steigern, wobei hier jedoch kein zweiter Detektor, wie bei dem gerade beschriebenen Konzept, erforderlich ist.

Plaziert man den Langpaßfilter in den Raum zwischen Objektiv und Tubuslinse, d. h. in den "unendlichen Bereich" der in Fig. 1 als Mikroskop 14 bezeichneten Anordnung, wird alles vom Objektiv aufgesammelte Licht zurück auf

die Probe fokussiert und auf den Kondensor gerichtet, wo es zusammen mit dem unmittelbar von der Probe kommenden Licht mit einem einzigen Detektor aufgesammelt werden kann.

Da insbesondere bei stark streuenden Proben das apparate Gesichtsfeld oftmals weit größer als das reelle sein kann, ist zum Registrieren von stärker gestreutem Emissionslicht vorzugsweise eine Detektionsoptik vorgesehen, die so ausgelegt ist, daß sie Licht sowohl aus einem interessierenden Gesichtsfeld als auch zusätzlich in einer streuenden Probe gestreutes Licht aus einem virtuellen Gesichtsfeld aufammelt.

Alternativ kann möglichst viel des vom Objekt emittierten Lichtes auch mit einem einzigen, hinter dem Objektiv plazierten Detektor erfaßt werden, wenn ein Spiegel derart angebracht wird, daß er das in Transmissionsrichtung emittierte Licht zurückreflektiert, so daß es zusammen mit dem Epifluoreszenzlicht vom Objektiv aufgesammelt werden kann. Vorzugsweise ist dabei die Spiegelfläche derart dichroitisch ausgebildet, daß sie Anregungslicht durchläßt und nur vom Objekt emittiertes Licht reflektiert. Bei geeigneter Ausbildung und/oder Platzierung dieses Spiegels kann die Sammeleffizienz größer sein als es der numerischen Apertur des Objektivs entspricht, dann nämlich wenn durch die optische Anordnung die numerische Apertur des in Transmissionsrichtung emittierten Lichtes verkleinert wird.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird ferner durch ein punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop der eingangs genannten Art gelöst, welches für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ausgelegt ist, wobei die gesamte Mikroskopoptik durch eine einzige Spiegelanordnung ersetzt wird. Zum Beispiel kann im Strahlengang hinter dem Objekt ein parabolischer Spiegel so plaziert werden, daß er aus parallelem Anregungslicht am Ort des Objekts einen beugungslimitierten Spot erzeugt, und wobei im Strahlengang vor dem Objekt als Selektionsanordnung ein dichroitischer Strahlteiler angeordnet ist, der Anregungslicht von Fluoreszenzlicht trennt und Fluoreszenzlicht, das von dem Objekt in Richtung des Strahlteilers emittiert wird, zusammen mit von der Spiegelanordnung reflektiertem Fluoreszenzlicht unmittelbar auf die Detektoranordnung auffallen läßt. Prinzipiell können statt parabolischer auch elliptische Oberflächen zur Erzeugung des beugungslimitierten Spots herangezogen werden. Statt eines kollimierten Anregungsstrahls wird dann ein divergentes Strahlbündel benötigt.

Die genannte parabolische Spiegelanordnung kann von einem mit einer Immersionsflüssigkeit gefüllten Trog gebildet sein, dessen Innenwandung verspiegelt ist und der mit einem Deckglas abgedeckt ist, das auf seiner der Spiegelanordnung zugewendeten Innenseite das Objekt trägt, oder sie kann von einem massiven Glaskörper gebildet sein, der auf seiner einen Seite plan ist und der auf seiner anderen Seite parabolisch geformt und verspiegelt ist, wobei der Glaskörper an seiner planen Seite mit einer mit Immersionsflüssigkeit gefüllten Kammer versehen ist, in welche das Objekt eintaucht.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden nachstehend unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines punktabtastenden Luminiszenz-Mikroskops, bei welchem sich bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung realisieren lassen;

Fig. 2 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Scanvorrichtung zur schnellen Feinpositionierung;

Fig. 3 eine schematische Darstellung einer bevorzugten Ausführungsform des vorliegend beschriebenen punktabtastenden Luminiszenz-Mikroskops, bei welchem eine opti-

sche Pinzette zum Halten und Bewegen des zu untersuchenden Objekts eingesetzt wird;

Fig. 4 eine schematische Darstellung der Bilderfassung mittels eines CCD-Chips, der als konfokale Blende eingesetzt wird;

Fig. 5 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform des punktabtastenden Luminiszenz-Mikroskops, bei welchem für eine spektrale Aufspaltung des Emissionslichts gesorgt ist;

Fig. 6 eine Prinzipdarstellung für die Erzeugung eines Rechteckimpulses zur Anregung einer zu untersuchenden Probe;

Fig. 7 eine schematische Darstellung einer Anordnung, mit welcher sich Rechteckimpulse gemäß Fig. 6 erzeugen lassen;

Fig. 8 eine schematische Darstellung einer Anordnung, mit welcher sich eine gleichzeitige Detektion von emittierten Photonen im Objektiv- und Kondensorstrahlengang realisieren läßt;

Fig. 9 eine Ansicht ähnlich Fig. 8, mittels deren eine Detektion von in allen Raumrichtungen emittierten Photonen mit dem Kondensor erfolgt;

Fig. 10 eine schematische Darstellung der durch Lichtstreuung bedingten Vergrößerung des apparenten Gesichtsfelds im Vergleich zum reellen Gesichtsfeld eines streuenden Objekts;

Fig. 11 ein optisches System, mit welchem ein möglichst großer Anteil des von einem zu untersuchenden Objekt emittierten Lichts durch das Objektiv erfaßt werden kann;

Fig. 12 und 13 Ausführungsformen des in Fig. 11 skizzierten Systems, bei welchem auf ein Objektiv im klassischen Sinne verzichtet werden kann.; und

Fig. 14 eine Ansicht eines optischen Systems ähnlich Fig. 13, bei welchem ein zu untersuchendes Objekt sich von zwei gegenüberliegenden Seiten beleuchtet läßt.

Wie eingangs bereits geschildert wurde, zeigt Fig. 1 ein punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, wobei eine Scanvorrichtung, welche den Beleuchtungs-Spot relativ zum untersuchenden Objekt bewegt, als Scanvorrichtung 20 angedeutet ist. Die Scanvorrichtung 20 kann beispielsweise eine galvanometrische Scanvorrichtung sein, die für eine Grob-Positionierung des auf das Objekt 12 gerichteten Abtastlichtstrahls sorgt. Zur Fein-Positionierung des auf das Objekt 12 gerichteten Beleuchtungs-Spots kann die Scanvorrichtung 20 ferner eine Scanvorrichtung aufweisen, wie sie in Fig. 2 schematisch dargestellt ist.

In die Scanvorrichtung gemäß Fig. 2 einfallendes, paralleles, polarisiertes Anregungslicht 44, beispielsweise von einem Laser, wird nach Passieren eines Polarisationswürfels 46 über eine Linse 48 in eine Zwischenbildebene fokussiert und durch eine zweite Linse 50 wieder ins Unendliche abgebildet. Der Strahl passiert dann ein  $\lambda/4$ -Plättchen 52, wird von einem Planspiegel 54 reflektiert und durchläuft danach die Anordnung rückwärts bis zum Polarisationswürfel 46, wo er infolge der um  $90^\circ$  gedrehten Polarisation vom ursprünglichen Strahl 44 getrennt und in Richtung des Pfeils 56 gelenkt wird. Das dadurch in x-y-Richtung ablenkbare Anregungslicht kann entweder direkt einem Mikroskop zugeführt werden, oder aber einer Grob-Scanvorrichtung, welche größere Auslenkungen als der Piezoscanner zuläßt, und dann erst dem Mikroskop.

Die hier gezeigte Anordnung macht sich die Tatsache zunutze, daß bei geeigneter optischer Anordnung die Bewegung einer Linse um den Weg x eine Bewegung des Bildpunktes um den Betrag  $2x$  hervorrufen kann. Ferner erlaubt sie es, die Bewegung des Strahls in x- und y-Richtung voneinander mechanisch zu entkoppeln. Mit der gezeigten Anordnung läßt sich praktisch jedes bestehende Scansystem

einfach aufrüsten. Die Anordnung kann als kleine kompakte Einheit zwischen die in Fig. 1 gezeigte Lichtquelle 10 und die Scanvorrichtung 20 plazierte werden, bzw. einen Teil der Scanvorrichtung 20 bilden. Die gezeigte Scanvorrichtung eignet sich auch zum Einsatz in einem Reflexionsmikroskop.

Eine zweite praktikable Variante der Abtastung ist das sogenannte Objekts-Scan-Verfahren, bei welchem eine Scanvorrichtung (Scanvorrichtung 22 in Fig. 1) das zu untersuchende Präparat relativ zum dann fixen Fokuspunkt bewegt. Der Vorteil dieser Ausbildung liegt in den drastisch verringerten Anforderungen an die optische Güte (Planität) des optischen Systems. Sein Hauptnachteil ist die Langsamkeit, welche mit der mechanischen Bewegung des Objektes einhergeht. Bei der in Fig. 3 gezeigten Ausführungsform wird daher das zu untersuchende Objekt 12 nicht mitsamt seiner Halterung mechanisch, sondern in seinem Immersionsmedium mit Hilfe einer sogenannten optischen Pinzette 62 berührungsfrei bewegt. Das in Fig. 3 schematisch gezeigte Luminiszenz-Mikroskop verfügt über einen ähnlichen Aufbau wie das in Fig. 1 gezeigte Luminiszenz-Mikroskop, wobei jedoch bei der Ausführungsform gemäß Fig. 3 die Lichtquelle 10 für die Erzeugung von kollimiertem Anregungslicht so angeordnet ist, daß das Anregungslicht nicht die Scanvorrichtung 20 passiert, sondern daß es über den dichroitischen Strahlteiler 30 und das Objektiv 32 direkt auf das zu untersuchende Objekt 12 abgebildet wird. Dort, wo bei der Ausführungsform nach Fig. 1 die Anregungslichtquelle vorgesehen war, ist bei der Ausführungsform nach Fig. 3 eine weitere Quelle für kollimiertes Licht vorgesehen, wobei dieses Licht jedoch nicht als Anregungslicht sondern zum Bewegen der Probe 12, d. h. als optische Pinzette 62, dient. Analog zu der Fein-Positionierung des Abtaststrahls, wie sie unter Bezugnahme auf Fig. 2 erläutert wurde, kann die Anordnung nach Fig. 3 eine Feinpositionierungsanordnung gemäß Fig. 2 aufweisen, wobei hier jedoch nicht der Abtastlichtstrahl, sondern der kollimierte Lichtstrahl zum Halten und Bewegen der Probe feinpositioniert wird.

Das in Fig. 3 für den Fall einer konfokalen Abbildung gezeigte Prinzip läßt sich im Falle der Zweiphotonen-Anregung durch Weglassen der konfokalen Blende 24 und/oder durch Detektion des Emissionslichtes bereits zwischen Objektiv 32 und Scanvorrichtung 20 weiter vereinfachen.

Unter erneuter Bezugnahme auf Fig. 1 wird, wie bereits oben erwähnt wurde, vorzugsweise ein CCD-Chip zum Erfassen eines Bildes benutzt, wobei gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der CCD-Chip selbst als variable konfokale Blende 24 wirkt und hierfür der CCD-Chip synchron mit dem Scanvorgang ausgelesen wird. Dabei werden die Intensitätsinformationen der belichteten Pixel während des Scanvorgangs kontinuierlich oder pulsartig in der Übergangszeit zwischen zwei benachbarten Scanpunkten in die Speicherzone des Chips geschoben, von der sie kontinuierlich ausgelesen werden können.

Die Anordnung funktioniert jedoch nicht nur mit einem CCD-Detektor in der Detektorposition 16, wobei in diesem Falle das Bild des emittierenden Fokus stationär bleibt, sondern auch, wie es in Fig. 4 schematisch dargestellt ist, in der Detektorposition 22, wenn der Flächensensor in der ersten Zwischenbildebene plazierte ist. Der Leuchtpunkt bewegt sich dabei entsprechend der Scanbewegung über den Sensor, und die Bildinformation muß später im Rechner "sortiert" werden. In Fig. 4 gibt der Pfeil 66 die Scanbewegung an, während der Pfeil 68 die Richtung des Zeilenvorschubs angibt. Diese Anordnung bietet den zusätzlichen Vorteil, daß der Flächensensor in der Bildebene auch ganz normale "Weit-Feld" Bilder aufzeichnen kann, und zwar sowohl im Durchlicht, als auch in der Aufsichtfluoreszenz. Letzteres er-

fordert den Einsatz einer zusätzlichen Auflicht-Beleuchtung, wie sie im Stand der Technik bekannt ist. Dazu bietet sich eine polychromatische Beleuchtungseinheit an, wie sie in DE 42 28 366 C2 offenbart ist.

Ein weiterer Vorteil des Konzepts ist, daß sich das Emissionslicht spektral aufspalten läßt, wobei dies im Falle einer unendlich korrigierten Mikroskopoptik durch das Einbringen eines dispersiven Elementes, z. B. eines Prismas oder eines optischen Gitters, zwischen das Objektiv 32 und die Tubuslinse 36 bewerkstelligt werden kann. Eine derartige Anordnung ist in Fig. 5 gezeigt, in der nur der Bereich der in Fig. 1 insgesamt dargestellten Vorrichtung oberhalb der Tubuslinse 34 veranschaulicht ist. Anregungslicht, welches den dichroitischen Strahlteiler 30 in Fig. 5 von unten kommend passiert, wird über das Objektiv 32 auf das zu untersuchende Objekt 12 abgebildet. Von dem Objekt 12 emittiertes Licht wird nach Passieren des Objektivs 32 mittels des dichroitischen Strahlteilers 30 vom Anregungslicht getrennt, mittels eines Prismas 72 spektral zerlegt und über die Tubuslinse 36 auf die einen CCD-Flächensensor aufweisende Detektoranordnung 18 abgebildet. Damit wird der spektrale Bereich des Emissionslichtes auf einige Pixel verschmiert. Die Pixel dienen somit nicht nur als konfokale Blenden, sondern auch als Austritts-Spalte einer Spektrometeranordnung, wobei der Eintritts-Spalt von dem beleuchteten Fokuspunkt gebildet ist. Aus einer räumlichen Zuordnung einzelner Pixel können dann spektrale Informationen gewonnen werden.

Erfolgt die Anregung des zu untersuchenden Objekts wie eingangs beschrieben mittels Zweiphotonenabsorption, so werden gemäß bevorzugten Ausführungsformen des vorliegend beschriebenen punktabtastenden Luminiszenz-Mikroskops rechteckige Anregungslichtpulse eingesetzt, mit denen eine optimal lange Pulsdauer zur Vermeidung von unerwünschten Mehrphotonenabsorptionen bei minimaler Dauerbelastung erreicht werden kann.

Rechteckige Pulse mit einer Dauer von  $> 100$  fs können zum Beispiel durch Einsatz eines Etalons aus kurzen Einzelimpulsen zusammengesetzt werden, doch lassen sich auch andere Verfahren, welche Stand der Technik sind, dazu einsetzen.

In den Fig. 6 und 7 ist die Erzeugung eines Rechteckimpulses unter Verwendung mehrerer Einzelimpulse dargestellt, wobei Fig. 6 einen resultierenden Gesamtimpuls 74 zeigt, der aus zehn Einzelimpulsen 76 zusammengesetzt ist, während in Fig. 7 eine technische Realisierung des vorgeschlagenen Konzepts veranschaulicht. Aus Fig. 6 ist ersichtlich, daß je kürzer die Einzelimpulse sind, desto steiler ihre Flanken werden und desto besser sich die gewünschte Rechteckform approximieren läßt. Eine Folge von Einzelimpulsen, wie sie in Fig. 6 dargestellt ist, läßt sich beispielsweise dadurch erzeugen, daß eine Lichtquelle benutzt wird, die, wie in Fig. 7 dargestellt ist, eine ebene Wellenfront 78 erzeugt, und senkrecht zu der Ausbreitungsrichtung der ebenen Wellenfront 78 eine treppenförmige Transmissionsanordnung 80 plaziert ist. Da innerhalb der Transmissionsanordnung 80 die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichts Transmissionsanordnung 80 passierenden Lichts niedriger als außerhalb der Transmissionsanordnung 80 ist und da die in Fig. 7 als Pfeile 82 dargestellten Abschnitte einer auf die Transmissionsanordnung 80 auftreffenden Wellenfront 78 unterschiedliche Weglängen innerhalb der Transmissionsanordnung 80 zu passieren haben, ergibt sich hinter der Transmissionsanordnung 80 ein Versatz zwischen den einzelnen Abschnitten der auf die Transmissionsanordnung 80 auftreffenden Wellenfronten 78 und somit eine Folge von Einzelimpulsen entsprechend der in Fig. 6 dargestellten Folge von Einzelimpulsen 76. In zweckmäßiger Weise kann die Trans-

missionsanordnung 80 von einer treppenförmige Anordnung von Glasplättchen gebildet sein. Es ist allerdings darauf zu achten, daß alle Einzelpulse in der Objektiv-Pupille eine gleichmäßige Ortsverteilung aufweisen, da nur so eine beugungslimitierte Punktabbildung in der Objektebene gewährleistet ist.

Fig. 8 zeigt schematisch eine Ausführungsform eines Luminiszenz-Mikroskops, bei welchem, wie eingangs beschrieben, von einer Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung Gebrauch gemacht wird. In Fig. 8 sind die Teile des in Fig. 1 gezeigten Luminiszenz-Mikroskops unterhalb der Tubuslinse 34, d. h. die Zwischenbildebene 40, die Scanlinse 42, etc., der Einfachheit halber nicht dargestellt. Die in Fig. 8 gezeigte Anordnung bedient sich, analog zum Stand der Technik, des Objektivs 32 zur Erzeugung des abtastenden Beleuchtungsspot, benutzt zum Sammeln der emittierten Photonen jedoch nicht ausschließlich das Objektiv 32 (sogenannte Auflichtfluoreszenz), sondern auch einen auf der gegenüberliegenden Seite plazierten Kondensor 86, mittels dessen von dem zu untersuchenden Objekt 12 emittiertes Licht über eine Tubuslinse 92 auf einen Detektor 90 abgebildet wird. Bringt man ferner in den Kondensorstrahlengang noch einen weiteren dichroitischen Strahlteiler 88 ein, wie es in Fig. 8 dargestellt ist, kann der Kondensor 86 unter Verwendung einer Lichtquelle 94 auch zur Durchlichtbeleuchtung des Objekts 12 benutzt werden.

Das obige Konzept läßt sich auch ohne zweiten Detektor realisieren, indem, wie in Fig. 9 gezeigt, ein Langpaßfilter 96 im Strahlengang des Mikroskops 14 (siehe Fig. 1) plaziert wird. Der Langpaßfilter 96 läßt das langwellige Anregungslicht passieren und reflektiert das von dem zu untersuchenden Objekt 12 emittierte Fluoreszenzlicht. Plaziert man den Filter 96 in den Raum zwischen dem Objektiv 32 und der Tubuslinse 34, d. h. in dem "unendlichen Bereich" des Mikroskops 14, wird alles vom Objektiv 32 aufgesammelte Licht zurück auf die Probe 12 fokussiert und auf den Kondensor 86 gerichtet, wo es zusammen mit dem unmittelbar von der Probe 12 kommenden Licht mit einem einzigen Detektor 90 aufgesammelt werden kann. Unter Umständen kann es vorteilhaft sein, den Filter 96 geringfügig zu kippen, damit das emittierte Licht nicht unmittelbar auf seinen Ausgangspunkt zurückreflektiert wird. Fig. 9 zeigt des weiteren einen dichroitischen Strahlteiler 88, der die Verwendung einer Durchlichtbeleuchtung entsprechend Fig. 8 ermöglicht.

Um die signifikanten Vorteile der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere bei stark streuenden Präparaten auszunutzen, sollte nicht nur das emittierte Licht unter einem möglichst großen Raumwinkel aufgesammelt werden, sondern es sollte auch mit dem Detektor ein möglichst großer Bildfeldbereich erfaßt werden, da, wie in Fig. 10 schematisch dargestellt ist, infolge von Lichtstreuung das apparente Gesichtsfeld 100 weit größer als das reelle, interessierende Gesichtsfeld 102 eines zu untersuchenden streuenden Objekts 12 sein kann. Dazu ist gewöhnlich ein großflächiger Detektor nötig oder aber eine optische Anordnung, welche das aufgesammelte Licht wieder auf den Detektor bündelt.

Beim Studium lebenden biologischen Materials ist häufig die Verwendung sogenannter Wasser-Immersionsobjektive angeraten, bei denen eine physiologische Kochsalzlösung, in der das Präparat schwimmt, gleichzeitig als Immersionsflüssigkeit wirkt. Derartige Objektive lassen sich zwar mit einem langen Arbeitsabstand fertigen, jedoch ist ihre numerische Apertur verglichen mit der von Öl-Immersionsobjektiven deutlich reduziert. Zwar läßt sich die Sammeleffizienz eines optischen Systems mit Wasserimmersion durch Zuhilfenahme des Kondensors auf Werte von  $> 40\%$  steigern, doch können beim Einsatz geeigneter Spiegel auch ohne



allzu großen Aufwand deutlich höhere Effizienzen realisiert werden.

Fig. 1<sup>7</sup> zeigt ein optisches System, bei welchem eine Spiegelfläche 104, die in einem Material 106 angeordnet ist, das sowohl vor als auch hinter der Spiegelfläche 104 den gleichen Brechungsindex aufweist, einen beträchtlichen Teil des in die dem Objektiv abgewandte Richtung emittierten Fluoreszenzlichtes so zurückreflektiert (Pfeile 108), daß es vom Objektiv wieder aufgesammelt und dahinter registriert werden kann. Bei entsprechender Auslegung der reflektierenden Fläche läßt sich die numerische Apertur des emittierten Lichtes reduzieren, sodaß das Objektiv einen größeren Raumwinkel aufzusammeln vermag, als es seiner eigenen numerischen Apertur entsprechen würde. Die Spiegelfläche 104 ist vorzugsweise sphärisch, da sich dies am einfachsten realisieren läßt. Sie kann jedoch auch asphärisch, z. B. parabolisch oder elliptisch sein. Den gleichen Effekt kann auch ein Planspiegel bewirken, wenn er im Kondensor an der richtigen Stelle plaziert ist. Legt man die Verspiegelung in geeigneter Weise "dichroitisch" aus, können bei dieser Gelegenheit bereits Anregungslicht und Emissionslicht voneinander separiert werden, indem das Anregungslicht die dichroitische Fläche passieren kann, während das Emissionslicht reflektiert wird. Eine einfache Realisierung des Konzepts sieht die Einarbeitung der reflektierenden Fläche in einen Objektträger vor. Damit kann dann – zumindest für den von der Spiegelfläche transmittierten Spektralbereich – die übliche Kondensoranordnung zur Durchlichtbeleuchtung herangezogen werden.

Die in den Fig. 12 bis 14 gezeigte Version des angesprochenen Spiegelkonzepts kommt ganz ohne die Verwendung eines Objektivs aus. Mittels einer parabolischen Spiegelanordnung 110 wird aus parallelem Anregungslicht 112 am Ort der Probe 12 ein beugungslimitierter Spot erzeugt, wobei durch den außerordentlich großen Winkelbereich der zur Fokusbildung herangezogenen Strahlen eine bisher nur mit einer sogenannte 4 $\pi$ -Anordnung erzielte Auflösung erreicht werden kann. Zur Detektion des Emissionslichtes muß ein dichroitischer Strahlteiler 114 in den Strahl eingebracht werden, mittels dem das auf den Detektor abzubildende Emissionslicht 118 aus dem Strahlengang des Anregungslichts 112 ausgekoppelt wird. Bedingt durch die Tatsache, daß die optische Abbildung durch Spiegelsysteme zwar achromatisch, aber nur direkt im Fokus aberrationsfrei ist, empfiehlt sich die Abtastung des Präparats in x-, y- und z-Richtung durch Bewegen des Präparats 12 oder des Parabolspiegels 110, oder aber mit Hilfe einer optischen Pinzette (siehe Fig. 3, optische Pinzette 62).

Eine einfache Realisierung des Konzepts, wie sie in Fig. 12 dargestellt ist, besteht in einem mit einer Immersionsflüssigkeit 116 gefüllten Trog, dessen Innenwandung mit einer Verspiegelung 110 versehen ist. Ein Deckglas 120 bildet den Deckel des Trogs, wobei das Präparat auf der Trog-Innen-seite plaziert wird. Da das Präparat 12 unmittelbar mit der Immersionsflüssigkeit 116 in Kontakt kommt, sollte diese "präparatverträglich" gewählt werden. Für biologische Präparate bietet sich eine physiologische Kochsalzlösung an.

Ein zweites in Fig. 13 gezeigtes Realisierungskonzept sieht einen massiven Glaskörper 122 vor, der auf der einen Seite plan, auf der anderen parabolisch geformt ist. Die Verspiegelung 110 ist auf der Außenseite der Parabol-Fläche angebracht. Das Präparat 12 ragt in eine halbkugelig geformte Kammer, welche mit einer geeigneten Immersionsflüssigkeit 116 gefüllt und von einem Deckglas 124 verschlossen ist.

Das in Fig. 13 gezeigte Konzept läßt sich auf vorteilhafte Weise mit aus dem Stand der Technik bekannten Vorrichtungen kombinieren, indem man wie in Fig. 14 gezeigt zusätz-

lich noch ein Mikroskop-Objektiv 126 in den Strahlengang einbringt und die Probe 12 somit konfokal von zwei gegenüberliegenden Seiten beleuchtet. Für den Fall, daß die Abtastung durch Bewegung der Spiegelanordnung erfolgt, wobei das Präparat mittels optischer Pinzette fixiert wird, oder durch Bewegen des Präparats mittels optischer Pinzette bei festgehaltener Spiegelanordnung, kann auf ein Deckglas verzichtet werden. Dies und die Tatsache, daß emittierte Photonen auch aus zwei Hemisphären aufgesammelt werden, verleiht der Anordnung eine bisher unerreichte Auflösung.

#### Bezugszeichenliste

- 10 kollimierte Lichtquelle
- 12 Objekt
- 14 Mikroskop
- 16 Detektor in Position 1
- 18 Detektor in Position 2
- 20 Scanvorrichtung
- 22 Scanvorrichtung
- 24 konfokale Blende
- 26 dichroitischer Strahlteiler
- 28 Linse
- 30 dichroitischer Strahlteiler
- 32 Objektiv
- 34 Tubuslinse
- 36 Tubuslinse
- 40 Zwischenbildebene
- 42 Scanlinse
- 44 polarisiertes Anregungslicht
- 46 Polarisationswürfel
- 48 Linse
- 50 Linse
- 52  $\lambda_4$ -Plättchen
- 54 Spiegel
- 56 in Richtung Detektor (Fig. 2)
- 58 Piezoaktor y-Richtung
- 60 Piezoaktor x-Richtung
- 62 optische Pinzette
- 66 Richtung der Scanbewegung
- 68 Richtung des Zeilenvorschubs
- 72 Prisma
- 74 Rechteckimpuls
- 76 Einzelimpuls
- 78 ebene Wellenfront
- 80 treppenförmige Transmissionsanordnung
- 82 Abschnitte einer Wellenfront 78
- 86 Kondensor
- 88 dichroitischer Strahlteiler
- 90 Detektor in Position 3
- 92 Tubuslinse
- 94 Durchlichtbeleuchtung
- 96 Langpaßfilter
- 100 apparentes Gesichtsfeld
- 102 reelles Gesichtsfeld
- 104 Spiegelfläche
- 106 Material gleichen Brechungsindex
- 108 Pfeil in Richtung Objektiv (Fig. 11)
- 110 Parabolspiegelfläche
- 112 Anregungslicht
- 114 dichroitischer Strahlteiler
- 116 Immersionsflüssigkeit
- 118 Emissionslicht
- 120 Deckglas (Fig. 12)
- 122 Glaskörper
- 124 Deckglas (Fig. 13)
- 126 Mikroskop-Objektiv

1. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit:
- mindestens einer kollimierten Lichtquelle (10) zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls,
  - einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt (12) bündelt,
  - mindestens einer Detektoranordnung (16, 18) zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht,
  - einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und
  - einer Scanneranordnung (20, 22), die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt **dadurch gekennzeichnet**, daß die Scanneranordnung (20, 22) Piezoaktoren (58, 60) zum Erzielen von Scanbewegungen zwischen Abtastlichtstrahl und Objekt (12) aufweist.
2. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für jede Scanrichtung des Abtastlichtstrahls ein mit einem Piezoaktor (58, 60) gekoppeltes optisches Element (48, 50) vorgesehen ist, das mittels des zugehörigen Piezoaktors verstellbar ist und dabei den Abtastlichtstrahl zu einer Scanbewegung in der betreffenden Scanrichtung veranlaßt.
3. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine mittels den Piezoaktoren (58, 60) verstellbare optische Pinzette (62) zum Verstellen des zu untersuchenden Objekts (12) gegenüber dem Abtastlichtstrahl vorgesehen ist.
4. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle (10) zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt (12) bündelt, mindestens einer Detektoranordnung (16, 18) zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung (20, 22), die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Scanneranordnung eine optische Pinzette (62) zum Verstellen des zu untersuchenden Objekts (12) gegenüber dem Abtastlichtstrahl aufweist.
5. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optische Pinzette (62) mittels Piezoaktoren (58, 60) verstellbar ist.
6. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Scanneranordnung (20, 22) eine für Grobbewegungen zwischen Abtastlichtstrahl und Objekt (12) sorgende Grob-Scannereinheit aufweist und die Piezoaktoren (58, 60) bzw. die optische Pinzette (62) Teil einer Fein-Scannereinheit sind bzw. ist.
7. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Grob-Scannereinheit als galvanometrische Scannereinheit

ausgebildet ist.

8. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fein-Scannereinheit als Zoom-Einheit ausgelegt ist.

9. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fein-Scannereinheit als Korrektereinheit zur Kompensation von Fehlern der Grob-Scannereinheit und/oder zum Beeinflussen der Bewegungscharakteristik der Grob-Scannereinheit ausgebildet ist.

10. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle (10) zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt (12) bündelt, mindestens einer Detektoranordnung (16, 18) zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung (20, 22), die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit einer konfokalen Blende (24), **dadurch gekennzeichnet**, daß die Detektoranordnung (20, 22) einen Flächensensor aufweist, der selbst die konfokale Blende (24) bildet.

11. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Flächensensor als Flächensensor ein CCD-Chip vorgesehen ist.

12. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Flächensensor derart ausgelegt ist, daß Intensitätsinformationen von belichteten Pixeln des Flächensensors während des Scanvorgangs in eine Speicherzone des Flächensensors geschoben werden.

13. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Flächensensor eine Shiftfrequenz hat, die deutlich größer als die Scanfrequenz des Mikroskops ist.

14. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Aufspaltung des von dem Objekt (12) emittierten Lichts ein dispersives Element (72) vorgesehen ist.

15. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle (10) zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt (12) bündelt, mindestens einer Detektoranordnung (16, 18) zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung (20, 22), die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lichtquelle (10) zur Abgabe von Rechteckimpulsen (74) ausgelegt ist.

16. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß jeder



Rechteckimpuls (74) aus mehreren kurzen aufeinanderfolgenden Einzelimpulsen (76) zusammengesetzt ist.

17. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (10) eine Anordnung zur Erzeugung einer ebenen Wellenfront (78) sowie eine senkrecht zu der Ausbreitungsrichtung der ebenen Wellenfront angeordnete treppenförmige Transmissionsanordnung (80) aufweist.

18. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Transmissionsanordnung (80) eine treppenförmige Anordnung von Glasplättchen aufweist.

19. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle (10) zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt (12) bündelt, mindestens einer Detektoranordnung (16, 18) zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung (20, 22), die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, dadurch gekennzeichnet, daß ein zur Beleuchtung des Objekts (12) vorgesehenes Objektiv (32) zugleich zum Sammeln eines Teils der von dem Objekt emittierten Photonen genutzt ist und daß hinter einem Kondensor (86) des Objektivs (32) ein zweiter Detektor (90) plaziert ist.

20. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle (10) zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt (12) bündelt, mindestens einer Detektoranordnung (16, 18) zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung (20, 22), die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, dadurch gekennzeichnet, daß im Strahlengang des Mikroskops (14) ein Langpaßfilter (96) angeordnet ist, welcher langwelliges Anregungslicht passieren läßt, von dem Objekt (12) reflektiertes Fluoreszenzlicht jedoch reflektiert.

21. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Langpaßfilter (96) in dem Raum zwischen dem Objekt (12) und einer Tubuslinse (34) plaziert ist und daß im Strahlengang hinter einem Kondensor (86) des Objektivs (32) ein einziger Detektor (90) angeordnet ist.

22. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Langpaßfilter (96) derart angeordnet ist, daß er das vom Objektiv (32) aufgesammelte Licht zurück auf das Objekt (12) fokussiert und auf den Kondensor (86) richtet.

23. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Lang-

paßfilter (96) mit Bezug auf die Strahlengangachse derart geringfügig gekippt ist, daß das von dem Objekt (12) emittierte Licht nicht unmittelbar auf seinen Ausgangspunkt zurückreflektiert wird.

24. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß eine Detektionsoptik vorgesehen ist, die so ausgelegt ist, daß sie Licht sowohl aus einem interessierenden Gesichtsfeld (102) als auch zusätzlich in einer streuenden Probe gestreutes Licht aus einem virtuellen Gesichtsfeld (100) aufammelt.

25. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß im Strahlengang hinter dem Objekt (12) eine Spiegelfläche (110) angeordnet ist, die so gestaltet ist, daß sie von dem Objekt in Richtung des Anregungslichts emittiertes Fluoreszenzlicht zu dem Objektiv (32) zurückreflektiert.

26. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Spiegelfläche (110) derart dichroitisch ausgebildet ist, daß sie Anregungslicht durchläßt und im wesentlichen nur von dem Objekt (12) emittiertes Licht zurückreflektiert.

27. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Spiegelfläche (110) sphärisch ausgebildet ist.

28. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Spiegelfläche (110) asphärisch, insbesondere parabolisch oder elliptisch, ausgebildet ist.

29. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Spiegelfläche (110) in einen Objektträger eingearbeitet ist.

30. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop, insbesondere zur Untersuchung von biologischen Objekten, mit mindestens einer kollimierten Lichtquelle (10) zur Erzeugung eines Anregungslichtstrahls, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das Licht der Anregungslichtquelle auf ein zu untersuchendes Objekt (12) bündelt, mindestens einer Detektoranordnung (16, 18) zum Erfassen von von dem Objekt emittiertem Licht, einer optischen Anordnung (14, 32, 34), welche das von dem Objekt emittierte Licht sammelt und der Detektoranordnung zuführt, und einer Scanneranordnung (20, 22), die eine Relativbewegung zwischen dem Abtastlichtstrahl und dem Objekt in mindestens zwei Richtungen bewirkt, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 9, für die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, dadurch gekennzeichnet, daß im Strahlengang hinter dem Objekt (12) eine parabolische Spiegelanordnung (110) derart plaziert ist, daß sie aus parallelem Anregungslicht am Ort des Objekts einen beugungslimitierten Spot erzeugt, und daß im Strahlengang vor dem Objekt als Selektionsanordnung ein dichroitischer Strahlteiler (114) angeordnet ist, der Anregungslicht von Fluoreszenzlicht trennt und Fluoreszenzlicht, das von dem Objekt in Richtung des Strahlteilers emittiert wird, zusammen mit von der Spiegelanordnung reflektiertem Fluoreszenzlicht unmittelbar auf die Detektoranordnung auffallen läßt.

31. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß mittels der Scanneranordnung (20, 22) das Objekt oder die Spiegelanordnung (110) verstellbar ist.

32. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 30 oder 31, gekennzeichnet durch einen mit

einer Immersionsflüssigkeit (116) gefüllten Trog, dessen Innenwandung zur Bildung der parabolischen Spiegelanordnung (110) verspiegelt ist und der mit einem Deckglas (120) abgedeckt ist, das auf seiner der Spiegelanordnung zugewendeten Innenseite das Objekt (12) trägt. 5

33. Punktabtastendes Luminiszenz-Mikroskop nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß ein massiver Glaskörper (122) vorgesehen ist, der auf seiner einen Seite plan ist und der auf seiner anderen Seite 10 zur Bildung der parabolischen Spiegelanordnung (110) parabolisch geformt und auf der Außenseite der Parabolfläche verspiegelt ist, und daß der Glaskörper an seiner planen Seite mit einer mit Immersionsflüssigkeit (116) gefüllten Kammer versehen ist, in welche das 15 Objekt (12) eintaucht.

---

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

---

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

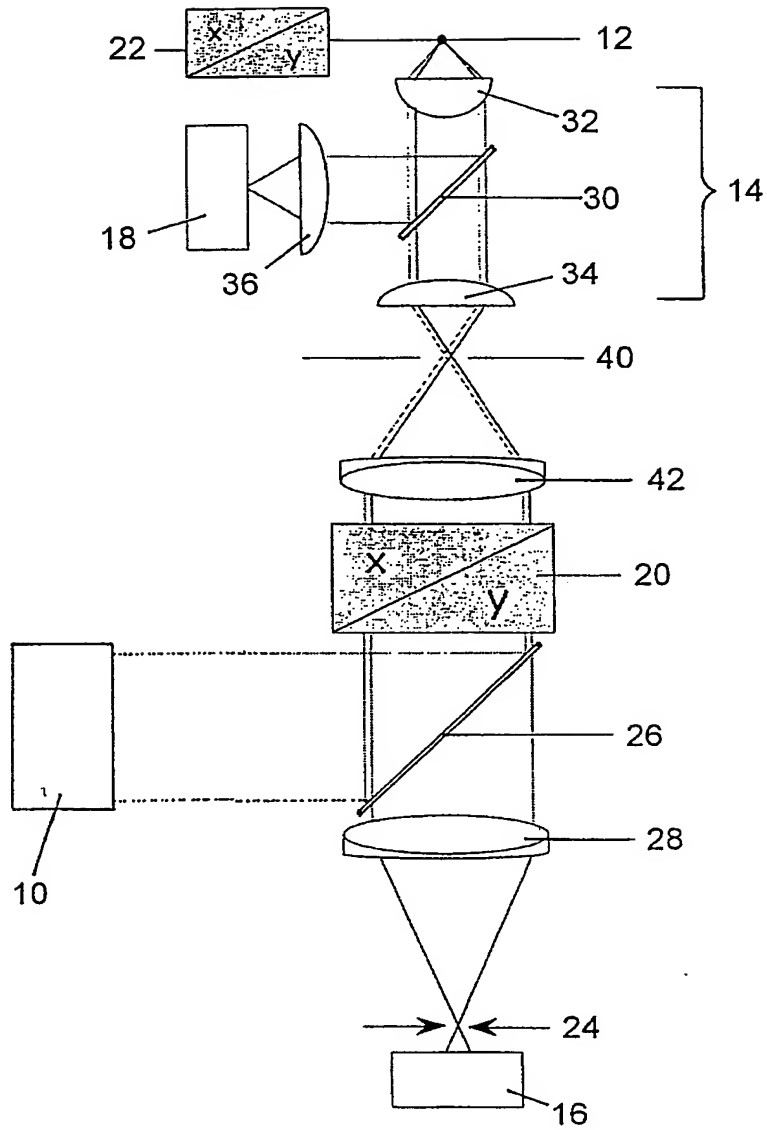


FIG. 1

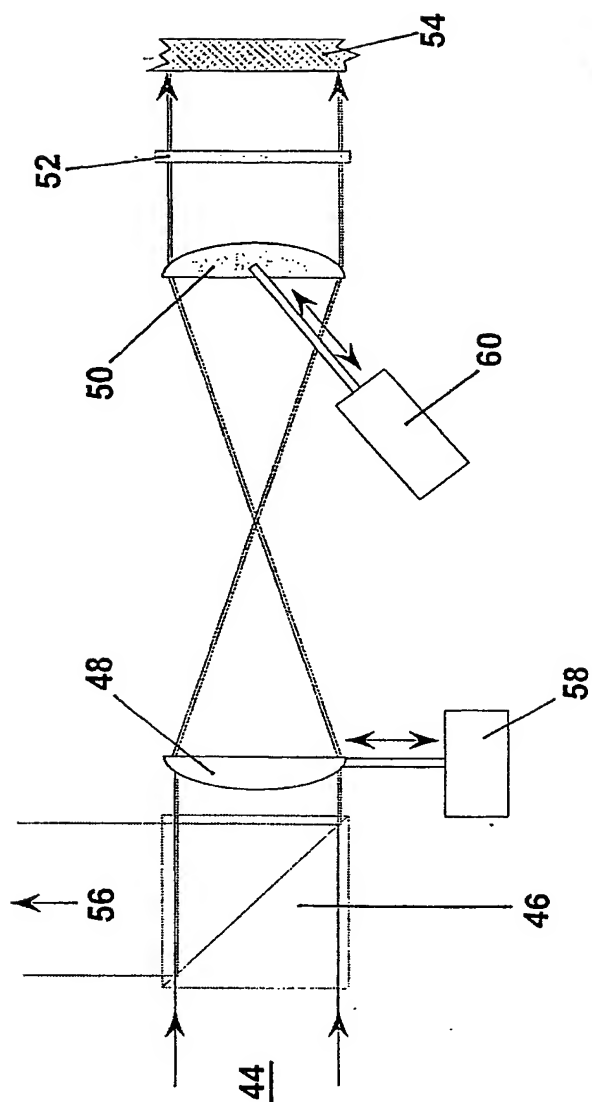


FIG. 2

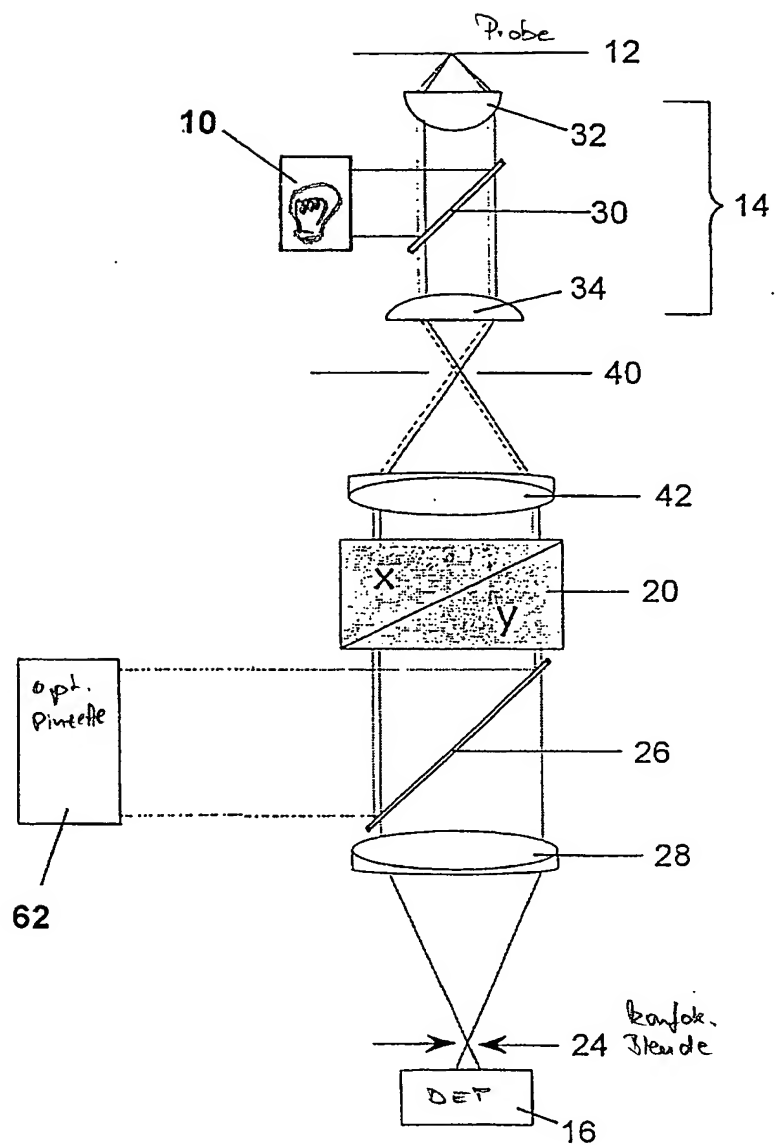


FIG. 3



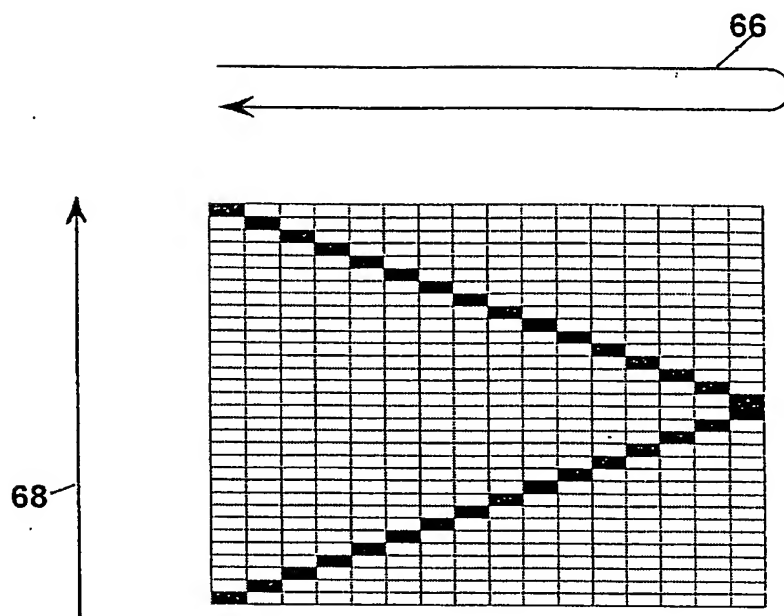
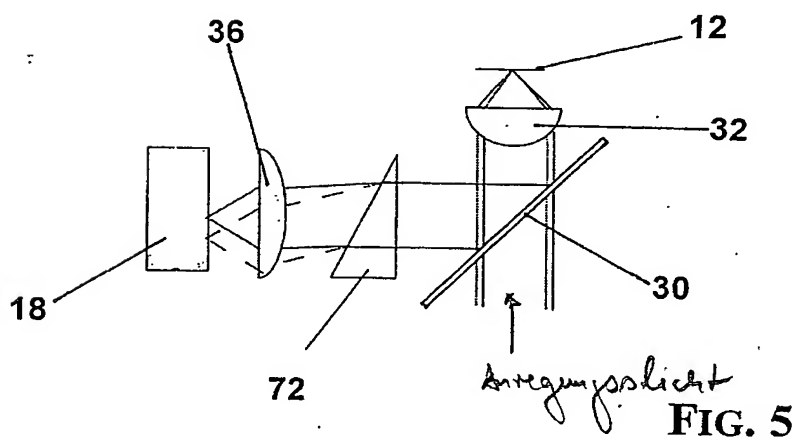


FIG. 4



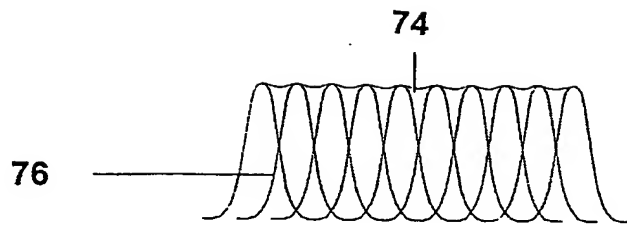


FIG. 6

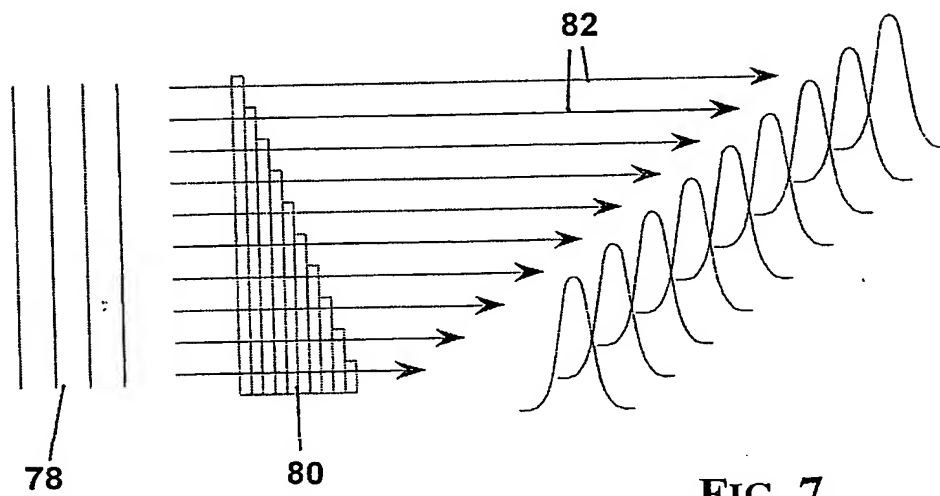


FIG. 7

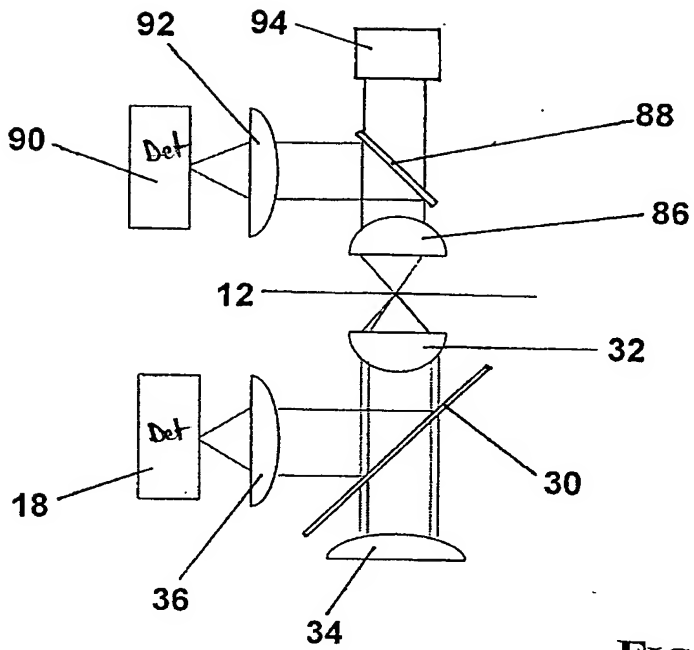


FIG. 8

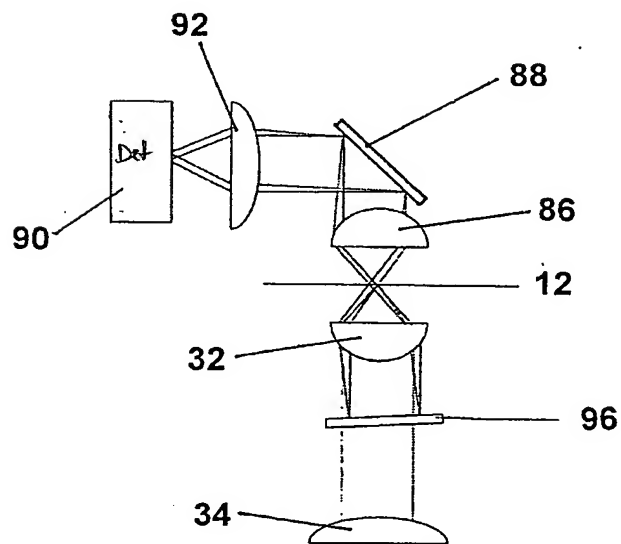
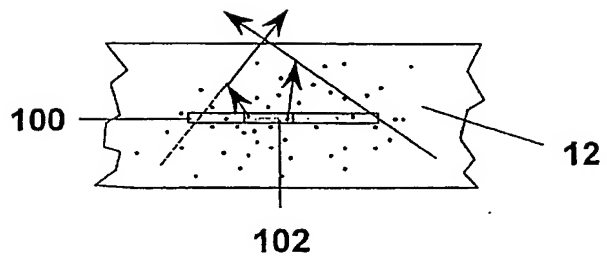
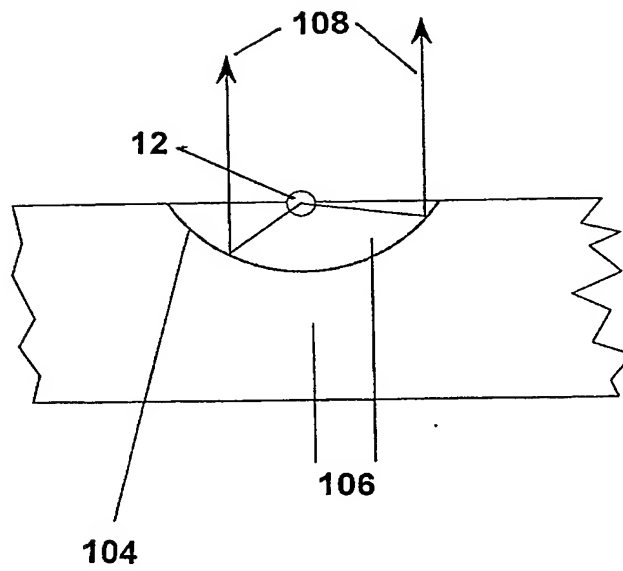


FIG. 9



**FIG. 10**



**FIG. 11**

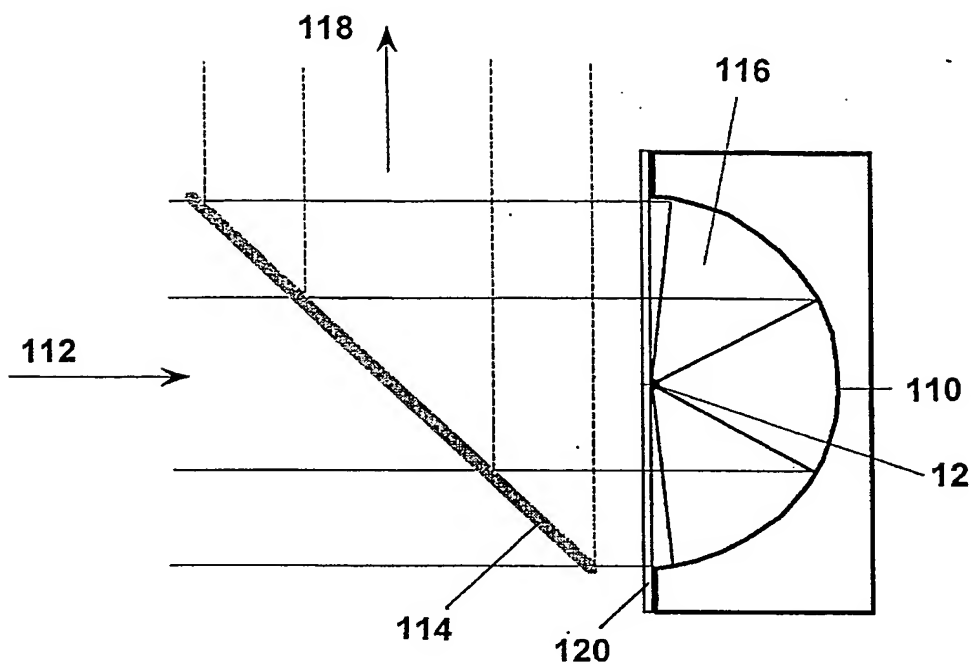


FIG. 12

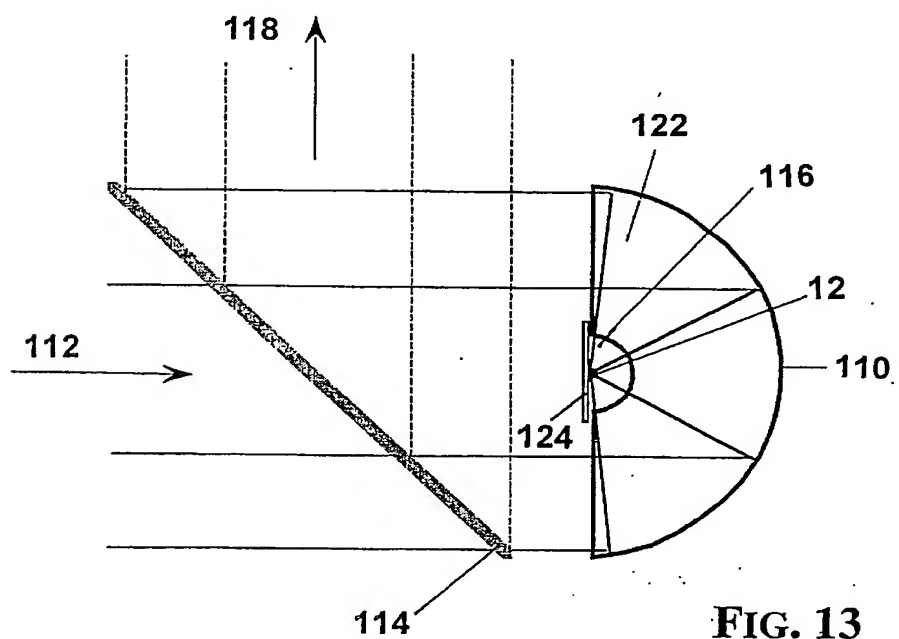


FIG. 13

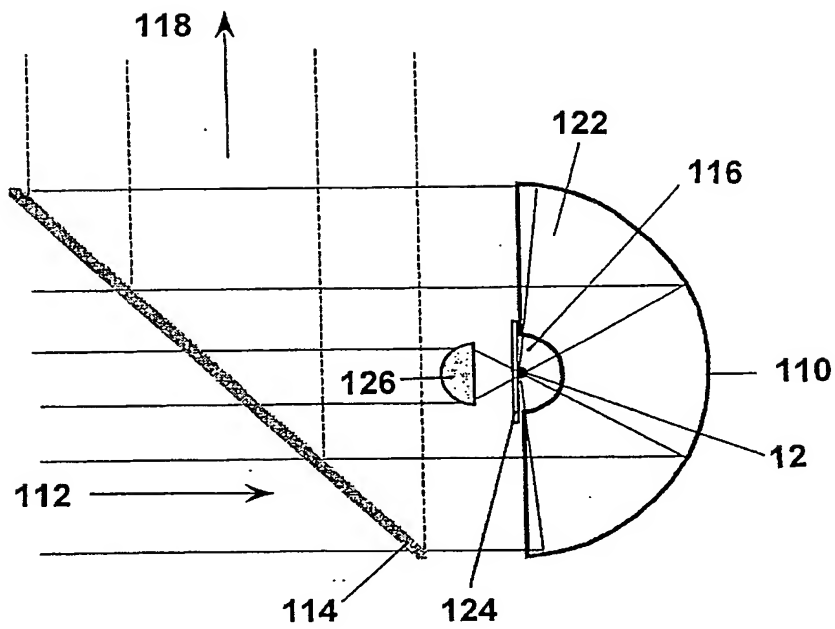


FIG. 14